

SIMON und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 95, 416 (1961). — 91. BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 98, 413 (1962). — 92. BONTING, S. L. und L. L. CARAVAGGIO, Arch. Biochem. Biophysics 101, 37 (1963). — 93. BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 101, 47 (1963). — 94. BONTING, S. L., L. L. CARAVAGGIO, M. R. CANADY und N. M. HAWKINS, Arch. Biochem. Biophysics 106, 49 (1964). — 95.

VATES, T. S., Jr., S. L. BONTING und W. W. Oppelt, Amer. J. Physiol. 206, 1165 (1964). — 96. HERSHEY, F., C. LEWIS, J. MURPHY und T. SHIFF, J. Histochem. Cytochem. 8, 41 (1960). — 97. HOLTER, H. und K. LINDERSTRØM-LANG, Physiol. Reviews 31, 432 (1951). — 98. LINDERSTRØM-LANG, K., Selected Papers. Danish Science Press, Copenhagen and Academic Press New York und London (1962).

Prof. Dr. H. Mattenheimer
1153 West Congress Parkway
Chicago 60612, Ill., USA

Über die Mineralsubstanz der Kalkkörper von *Squalus acanthias* (Dornhai)

Zur molekularen Anatomie der Wirbelsäule, I. Mitteilung

Von M. LIEFLÄNDER, K. THOMAS, E. BOHN und H. FLACHSBART

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen

(Eingegangen am 5. April 1968)

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

Knorpel- (Dornhai, Tigerhai) und Knochensubstanzen (Rind) wurden nach 3 verschiedenen Verfahren aufgeschlossen, um die anorganische Skeletsubstanz zu isolieren. Mit Papain erhielt man aus der Wirbelsäule des Dorn- und Tigerhais unversehrt die Kalkkörper, die mit chemischen und physikalischen Methoden auf ihre molekulare Zusammensetzung hin untersucht wurden. Die anorganische Skeletsubstanz der Kalkkörper der Selachierwirbelsäulen unterscheidet sich röntgenographisch und IR-spektroskopisch nicht von der anorganischen Knochensubstanz höherer Wirbeltiere. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß die anorganische Skeletsubstanz der Selachierwirbelsäule der Struktur nach einem Octacalciumphosphatcarbonat entspricht. Legt man nur die Calcium-, Phosphat- und Carbonatanalysen zugrunde, so kann man für die anorganische Skeletsubstanz der Selachier folgende Formel $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_{0.6}(\text{CO}_3)_{0.4}$ vorschlagen.

Cartilage (sword fish, tiger shark) and bone (bovine) were degraded by three different methods, in order to isolate the inorganic skeletal material. Undamaged calcified structures were isolated from the vertebral column of the sword fish and tiger shark, and their molecular composition was studied by chemical and physical methods. The calcified material of the selachial vertebral column was the same as the inorganic bone substance of higher vertebrates when studied by X-ray and IR-spectrophotometry. The present results indicate that the inorganic skeletal substance of selachial vertebral column consists of octacalcium phosphate carbonate. By basing the formula only on the calcium, phosphate and carbonate analyses, the inorganic skeletal substance of the sharks may be represented by the formula $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_{0.6}(\text{CO}_3)_{0.4}$.

Die Mineralisierung von Knochen und Knorpel ist ein komplizierter, bis heute noch nicht völlig durchschaubarer Prozeß (1). Obwohl ein verkalkter Knorpel seiner Struktur nach etwas anderes ist als ein Knochen, sollten doch gewisse Grundvorgänge der Mineralisierung in beiden Geweben ähnlich verlaufen.

Ein passendes Objekt für die Erforschung der Knorpelmineralisierung scheint uns, auch im Hinblick auf die biochemische Evolution des Bindegewebes, der im Atlantik lebende Dornhai *Squalus acanthias* zu sein. Sein Endoskelet besteht nahezu vollständig aus hyalinem Knorpel, wobei die Elemente der Wirbelsäule in einem direkt wahrnehmbaren Ausmaß verkalkt sind.

Im Gegensatz zu den Verkalkungen der Pflanzen und Wirbellosen überwiegt bei den Verkalkungen der Wirbeltiere Calciumphosphat eindeutig das Calciumcarbonat (2). Röntgenographische und chemisch-analytische Untersuchungen an einem umfangreichen Material führten KLEMENT (3) zu dem Ergebnis, daß es sich dabei um Apatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ handeln müsse. Von Knorpelfischen wurden chemische Mineralanalysen der Zähne vom Menschenhai *Carcharias fasciatus* sowie Fluoranalysen der Knorpelplatte und Zähne

einer *Lamna*-Art angegeben; besonders viel Fluorid enthielten die Zähne von *Heptanchus cinereus*.

Die Mineralisierung des Selachierknorpels tritt besonders an den Stellen auf, wo auch eine reichliche Kollagenabscheidung stattfindet (4). Wie polarisationsoptische Untersuchungen an Brustflossenknorpel vom Hundshai *Galeus canis* ergaben, sind die Beziehungen zwischen dem Kollagen und der Calciumverbindung die gleichen wie im Knochengewebe. Die Kristallite des Calciumphosphats folgen mit ihrer negativen Achse dem Zug der Kollagenfasern (5). Im Knochen lassen sich die Kristallite ($200\text{--}4000 \text{ \AA} \cdot 15\text{--}30 \text{ \AA}$) elektronenmikroskopisch nachweisen, und man kann sie sich durch Adsorptionskräfte an die Oberfläche der Kollagenfasern gebunden denken (6).

Bisher liegen unseres Wissens chemische Analysen der Bestandteile des Selachierwirbels und Schädels — bis auf einige Mucopolysaccharidanalysen (7) — nicht vor. In dieser Arbeit berichten wir daher über Zusammensetzung und Aufbau der anorganischen Substanz der Wirbelkörper vom Dornhai. Die Kenntnis der Bausteine ist ja Voraussetzung für alle weiteren physiologisch-chemischen Untersuchungen.

Tab. 1
 Wasser-, Calcium- und Phosphoranalysen von Dornhai-Knorpel

Knorpel	Naßgewicht (g)	Trockengewicht (g)	(% d. Ng.)	Glühverlust (%)	Ca (%)	PO ₄ (%)	Atomverhältnis Ca/P
Schädel	14,90	2,81	18,8	76,36	27,59	39,24	1,66
Wirbelsäule	34,88	8,99	25,8	74,26	36,84	61,86	1,41
Flossen	9,50	2,13	22,4	67,80	28,19	40,94	1,63

 Tab. 2
 Glührückstandsbestimmungen sowie Calcium- und Phosphoranalysen eines Dornhaiwirbelknorpels nach verschiedenen Aufschlußverfahren

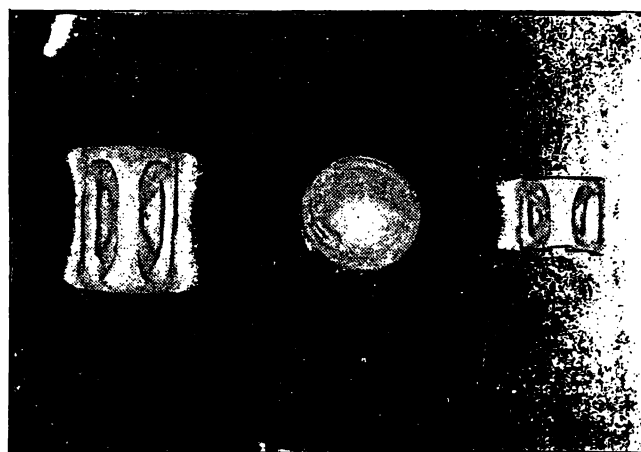
Aufschluß mit	Glühverlust (%)	Glührückstand (%)	Bezogen auf Glührückstand		Atomverhältnis Ca/F	Molares Verhältnis Ca:PO ₄
			% Ca	% PO ₄		
Formamid	23,00	77,00	36,60	57,15	1,51	1:0,66
Glycerin-KOH	22,80	77,20	38,70	56,45	1,62	1:0,61
Papain	28,80	71,20	36,60	59,10	1,46	1:0,68
Unbehandelt	73,00	27,00	32,45	54,70	1,40	1:0,71

Anorganische Bestandteile des Wirbelkörpers

Die Skelete von Dornhaien verschiedener Größen (≤ 50 cm; 50–70 cm; 90 cm Länge) wurden sauber präpariert. Zur Untersuchung kamen die Wirbelsäulen, zum Vergleich wurde auch der Brustflossenknorpel sowie das Chondrocranium mit herangezogen. Tabelle 1 gibt den Wasser-, Calcium- und Phosphatgehalt der einzelnen Gewebe sowie deren Glührückstand an.

Um die *anorganischen Skeletsubstanzen* von anhaftendem Bindegewebe zu befreien, mußten wir die Knorpel aufschließen. Infolge der innigen Verbindung des widerstandsfähigen Kollagens mit den äußerst fein verteilten anorganischen Salzen, konnte die Trennung nur mit relativ aggressiven Mitteln geschehen. Die von GABRIEL (8) angewandte Methode, organische Substanzen durch Erhitzen mit Glycerin-Kalilauge auf 200° zu entfernen, führte nicht nur zur Zerstörung der geometrischen Form der Kalkkörper, sondern auch zu einer Veränderung des chemischen und kristallinen Aufbaus der Calciumsalze. Wasserfreies Formamid bewirkte einen schonenderen Aufschluß bei neutraler Reaktion (9), ohne die meisten Minerale anzugreifen; doch auch hier wurden — wenigstens zu einem Teil — die Kalkkörperfiguren zerstört. Um die im Wirbelknorpel vorhandenen Mucopolysaccharide zu isolieren, wandten wir den enzymatischen Abbau mit Papain bei 65° und pH 5,6 an. Diese Protease baut unter den genannten Versuchsbedingungen auch Kollagen schnell ab. Als Rückstände hinterblieben die Kalkkörper stets in ihrer unversehrten, natürlichen Form (Abb. 1). Wie die Kalkkörper in der Wirbelsäule angeordnet sind, zeigen Röntgenbilder vom Ganztier (10).

Glührückstandsbestimmungen an einer nach den 3 genannten Methoden aufgeschlossenen Wirbelsäule ergaben das in Tabelle 2 aufgeführte Ergebnis. Hiernach enthielten die Kalkkörper, die nach dem Abbau mit Papain übrigblieben, den höchsten Anteil an organischer Substanz, die mit Formamid aufgearbeiteten etwa gleichviel wie die mit KOH-Glycerin behandelten. Die Glührückstände der nicht aufgeschlossenen Wirbelknorpel enthielten die größten Mengen, die der vorher mit Glycerin-KOH aufgeschlossenen die kleinsten


 Abb. 1
 Kalkkörper aus der Wirbelsäule von *Squalus acanthias* nach Abbau der Knorpelsubstanz mit Papain. Mitte: Ansicht eines Kalkkörpers von vorn

Mengen an Phosphat. Formamid- und Papainaufschlüsse ergaben Kalkkörper mit dazwischen liegenden Phosphatwerten. Offenbar wurden bei der Anwendung des Gabriel-Verfahrens Phosphate in weitaus größerem Maße in Lösung gebracht als bei den anderen Verfahren.

Die Analysendaten der anorganischen Substanz der Kalkkörper verschieden großer Dornhaie und eines Tigerhais sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Es ist daraus ersichtlich, daß die Zusammensetzung der anorganischen Skeletsubstanz nur innerhalb sehr enger Grenzen schwankt. Vergleicht man den Calcium-, Phosphat- und Carbonatgehalt mit den für höhere Wirbeltiere geltenden Werten (11), so findet man bei den Knorpelfischen im Durchschnitt höhere Phosphat- und niedrigere Carbonatwerte. Seit langem ist bekannt, daß der Fluorgehalt der anorganischen Skeletsubstanz von Landsäugetieren sehr gering (im Durchschnitt etwa 0,05% F), der von Meeressäugtieren hingegen wesentlich höher (etwa 0,55% F) liegt. Auch Süß- und Salzwasserfische zeigen den entsprechenden Unterschied im Fluorgehalt (3). Die relativ hohen Werte für Fluor in den Kalkkörpern des Dorn- und Tigerhais (Tab. 3) überraschen daher nicht, sie passen gut in das allgemeine Bild. Aus Arbeiten von TRÖMEL

Tab. 3
Analysen der anorganischen Skeletsubstanzen der Wirbelsäule vom Dornhai (nach Papainbehandlung)

Kalkkörper aus	Glühverlust %	Gewichtsprozente bezogen auf Glührückstand** Glührückstand %	Ca %	PO ₄ %	Mg %	CO ₂ %	F %	Molares Verhältnis Ca:PO ₄ :CO ₂ :F	Atomverhältnis Ca/F
Dornhai I (≤ 40 cm Länge*)	29,25	70,75	37,40	57,60	0,46	3,86	0,75	1:0,649:0,068:0,042	1,54
Dornhai II (≤ 40 cm Länge)	27,35	72,65	37,25	56,20	0,35	3,95	0,80	1:0,638:0,071:0,045	1,57
Dornhai III (70 cm Länge)	27,40	72,60	37,55	58,70	0,50	3,10	0,68	1:0,659:0,055:0,038	1,52
Dornhai IV (92 cm Länge)	30,50	69,50	37,80	58,95	0,35	4,20	0,60	1:0,657:0,074:0,033	1,52
Tigerhai (65 cm Länge)	26,90	73,10	37,65	56,65	0,40	3,80	0,75	1:0,634:0,067:0,042	1,57
Mittelwert			37,53	57,62	0,41	3,78	0,77	1:0,647:0,067:0,042	1,54

* Länge des gesamten Fisches.

** Mittelwerte aus je 3 Einzelbestimmungen.

(12) und MEHMEL (13) wissen wir, daß Hydroxylapatit und Fluorapatit den gleichen Kristallaufbau haben. Außerdem besitzen Hydroxyl- und Fluorionen den gleichen Ionenradius, sie können sich in Verbindungen gleicher Bauart isomorph vertreten. Errechnet man auf Grund des in Tabelle 3 aufgeführten Mittelwertes den Anteil des Fluors, so ergibt sich, daß etwa ein Fünftel der Plätze der Hydroxylionen durch Fluorionen besetzt sein könnten.

KLEMENT zog (3) auf Grund seiner zahlreichen Untersuchungen bezüglich aller Wirbeltiere den Schluß, daß überall da, wo es im Skelet zu einer Anlagerung phosphathaltiger Substanz kommt, einzig und allein der Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ den Hauptbestandteil der anorganischen Skeletsubstanz bildet.

Nach neueren Erkenntnissen (1) scheint aber die Gewebssubstanz nicht die Bedingungen zu erfüllen, die eine spontane Kristallisation von Hydroxylapatit aus der Lösung zulassen. Zwischenstufen der Mineralisation müssen daher vorhanden sein. Sehr wahrscheinlich werden diese unter Mitwirkung der organischen Substanzen wie Kollagen, Glycosaminoglycan-Proteine usw. — etwa im Sinne der Epitaxie — gebildet, wobei die entstehenden Keime die energetischen Bedingungen an der Oberfläche der kollagenen Fasern ausnutzen. Daß kollagene Fasern in den Kalkkörpern vorliegen, zeigen histologische (4) und eigene analytisch-chemische Untersuchungen. In Tabelle 4 sind die Gewichte

einiger über P_2O_5 bei Raumtemperatur getrockneter Kalkkörper sowie die Hydroxyprolin-, Hexosamin- und Calciumanalysen nach 30stdg. Hydrolyse mit 6N Salzsäure bei 110° angegeben. Legt man dem Kalkkörperkollagen einen Hydroxyprolingehalt von 9% zugrunde¹⁾, so ergeben sich Kollagenwerte von etwa 17—20% pro Kalkkörper.

Nach NEWSELY (14) dürfte Octacalciumphosphat als die Ausgangssubstanz der Mineralisation angesehen werden, denn es kann bei genügendem Angebot an Calcium- und Phosphationen unter physiologischen Bedingungen ausfallen. Außerdem ist es seiner Struktur nach dem Apatit sehr ähnlich und seine Umwandlung in Apatit wird außer durch Alkali auch durch Fluoridionen stark begünstigt.

HAYEK (15) hält die Mineralsubstanz der Knochen für Octacalciumphosphatcarbonat. Anlaß zu seinen Überlegungen war die Tatsache, daß in der anorganischen Skeletsubstanz mehr CO_2 enthalten ist, als im Apatitgitter Platz hat, und daß HPO_4 -Gruppen nachgewiesen wurden (16). Es gelang ihm durch Umsetzen von CaHPO_4 mit CaCO_3 in wäßriger Suspension bei 37° eine Substanz mit blättrigem Aufbau herzustellen, die im Röntgenogramm und im IR-Spektrum der Knochensubstanz (Rind, Femur/Diaphyse) gleicht. Von Octacalciumphosphat unterschied es sich durch 2 CO_3 -Banden, ließ aber röntgenographisch kein CaCO_3 erkennen. Die Knochensubstanz muß demnach als ein Octacalciumphosphat definiert werden, in dem ein Teil des Hydrogenphosphates durch Carbonat ersetzt ist nach etwa folgender Formel $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_{0,4}(\text{CO}_3)_{0,6}$, modifiziert durch Nebenbestandteile wie Mg, Na, K, F usw.

Vergleicht man in Tabelle 3 unsere Werte, und zwar nur das Ca/F-Verhältnis mit der OCPC²⁾-Vorstellung, so ergibt der Mittelwert von 1,54 die Formel $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2(\text{HPO}_4)_{0,6}(\text{CO}_3)_{0,4}$ für die anorganische Knorpelsubstanz der untersuchten Selachierwirbel.

¹⁾ Genaue Aminosäurebausteinanalysen von aus Kalkkörpern isoliertem Kollagen werden demnächst veröffentlicht.

²⁾ Abkürzungen: OCPC = Octacalciumphosphatcarbonat; OCP = Octacalciumphosphat; HA = Hydroxylapatit.

Tab. 4
Hydroxyprolin-, Hexosamin- und Calciumgehalt einiger Kalkkörper von Dornhaien verschiedener Größe (Dornhai I < 50 cm, Dornhai II > 70 cm); Hydrolyse 30 Stdn. bei 110° in 6N HCl

Kalkkörpergewicht in mg	Hydroxyprolin (%)	Kollagen (%)	Hexosamin (%)	Calcium (%)
I				
8,30	1,51	16,7	0,48	26,71
10,34	1,57	17,4	0,44	25,14
26,32	1,52	16,9	0,55	24,69
29,14	1,54	17,1	0,46	26,42
33,56	1,53	17,0	0,55	25,98
II				
360,33	1,80	12,9	0,69	23,20
378,43	1,81	20,1	0,63	24,58
439,21	1,84	20,4	0,68	23,86
759,28	1,94	21,5	0,73	23,70
662,15	1,88	20,8	0,67	23,18

Röntgenographische Untersuchungen

Durch diese Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die anorganische Knorpelsubstanz der Selachier ebenso aufgebaut ist wie die Knochensubstanz höherer Wirbeltiere. Daher wurden Debye-Scherrer-Aufnahmen von pulverisierten Kalkkörpern verschiedener Dornhai mit den Aufnahmen von Rinderknochen (Femur/Spongiosa und Corticalis) verglichen. Die Kalkkörper wurden mit Hilfe des Formamidaufschlusses bzw. durch Papainabbau der Dornhaiwirbelsäule gewonnen. Die Rinderknochen waren nur mit Formamid behandelt worden.

Die auf diese Weise präparierten Kalkkörper und Knochen ergaben auf den Debye-Scherrer-Aufnahmen nur unscharfe Linien mit stark diffusem Untergrund, was wir auf nicht vollständig beseitigte organische Substanzen zurückführen. Die Aufnahmen der bei 600° getemperten Präparate ließen die Debye-Scherrer-Ringe einwandfrei erkennen. In der Anordnung und Intensität der Ringe waren zwischen Kalkkörpern, Knochen und einer verknocherten Hühnersehne keine Unterschiede festzustellen. Röntgendiagramme eines Calciumphosphates der Fa. Merck, das Hydroxylapatitstruktur besitzen soll, zeigten praktisch keine Unterschiede zu den Diagrammen obiger Substanzen (Tab. 5).

Tab. 5
Zusammenstellung der d-Werte (Debye-Scherrer-Aufnahmen) von

Calciumphosphat (Merck) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Hai- knorpel	Corticalis (Rind)	Spongiosa (Rind)	Verknocherte Hühnersehne
8,12			8,07	
5,24				
4,10			4,15	4,18
3,87	3,87	3,87	3,87	3,87
3,43	3,44	3,44	3,44	3,44
3,19				
3,08	3,15	3,10	3,15	3,17
			3,08	3,08
	3,04			
2,87	2,82			
2,81	2,81	2,81	2,81	2,81
2,78	2,75	2,75		
2,72	2,72	2,72	2,72	2,72
2,62	2,62	2,62	2,62	2,62
2,25	2,24	2,24	2,25	2,25
2,15	2,14	2,13	2,15	2,14
2,05	2,05	2,05	2,05	2,05
1,98	1,98	1,98	1,98	1,98
1,94	1,94	1,94	1,94	1,94
1,89	1,89	1,88	1,89	1,89
1,83	1,83	1,83	1,84	1,84
1,81	1,80	1,80	1,80	1,80
1,78	1,78	1,78	1,78	1,78
1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
1,71	1,71	1,71	1,71	1,71
1,51	1,51	1,51		1,51
	1,48	1,47		1,47
1,45	1,45	1,45		1,45

OCP und OCPC ergeben praktisch identische Röntgendiagramme (14), die dem des Apatits sehr ähnlich sind. Allerdings unterscheiden sie sich vom Apatit durch unschärfere Linien, was offenbar seine Ursache in der leichten Verschiebbarkeit der einzelnen Schichten des Gitters dieser Substanzen hat.

Messung der spezifischen Oberflächen

Die spezifischen Oberflächen der anorganischen Skeletsubstanzen wurden nach der BET-Methode (17) bestimmt, und zwar vor und nach der 600° Temperung

(Tab. 6). Hierzu evakuierten wir die pulverisierten Substanzen bei Raumtemperatur und 10^{-3} Torr bis zur Gewichtskonstanz, adsorbierten bei -183° Argon an die Oberfläche und berechneten aus der aufgenommenen Argonmenge die spezifische Oberfläche. Die spezifische Oberfläche der Kalkkörper ist sehr viel kleiner als die der angegebenen Knochen. Nach der Temperung bei 600° fanden Schrumpfungen der spezifischen Oberflächen in allen Fällen statt, bei den Kalkkörpern waren sie jedoch prozentual am geringsten.

Tab. 6
Oberflächenmessungen nach der Brunauer-Emmett-Teller-Methode (Formamidaabbau)

Substanz	Vor dem Glühen m^2/g	Nach dem Glühen (600°) m^2/g
Kalkkörper (Dornhai)	6,3	3,9
Spongiosa (Rind-Femur)	120,0	15,8
Corticalis (Rind-Femur)	120,0	6,6

Infrarotspektren

In Abbildung 2 sind die Infrarotspektren eines natürlichen Hydroxylapatits aus Norwegen (I), der anorganischen Knochensubstanz aus der Spongiosa (II) — Femur, Rind —, der anorganischen Substanz eines bei 600—700° getemperten (III) und eines ungetemperten Kalkkörpers (IV) aufgeführt.

Seiner Struktur nach enthält Hydroxylapatit zwei Atomgruppierungen, deren Bindungen zu diskreten Schwingungen angeregt werden können: die Hydroxyl- und Phosphatgruppe. Die Infrarotabsorption der Hydroxylgruppe liegt bei 3500 cm^{-1} bis 3400 cm^{-1} , außerdem findet man noch bei 630 cm^{-1} eine für die OH^- -Ionen charakteristische Bande. Die P-O-Bindung absorbiert die IR-Schwingungen im Bereich von 1200 cm^{-1} bis 950 cm^{-1} stark, jene unter 650 cm^{-1} etwas schwächer. In ihren IR-Spektren unterscheiden sich die anorganischen Skeletsubstanzen II, III und IV nicht sehr stark vom Spektrum des HA I. Allen dreien fehlt jedoch die Bande bei 630 cm^{-1} . Nach HAYEK (15) fehlt auch dem synthetischen OCPC diese Bande, sein Gesamtspektrum entspricht sogar weitgehend dem der anorganischen Knochensubstanz (Rind, Femur, Diaphyse). Die Spektren der nur mit Formamid aufgeschlossenen Spongiosa (II) und der nach Papainabbau der Dornhaiwirbelsäule gewonnenen Kalkkörper sind praktisch identisch.

Folgerung

Auf Grund unserer Ergebnisse können wir schließen, daß die anorganische Skeletsubstanz der Selachierwirbel mit der anorganischen Knochensubstanz höherer Wirbeltiere im wesentlichen identisch ist. Eine völlige Übereinstimmung zwischen Selachierkalkkörper, Knochen und OCPC kann im Hinblick auf die unterschiedlichen Mengen an Mg, F, CO_2 usw. auch nicht erwartet werden.

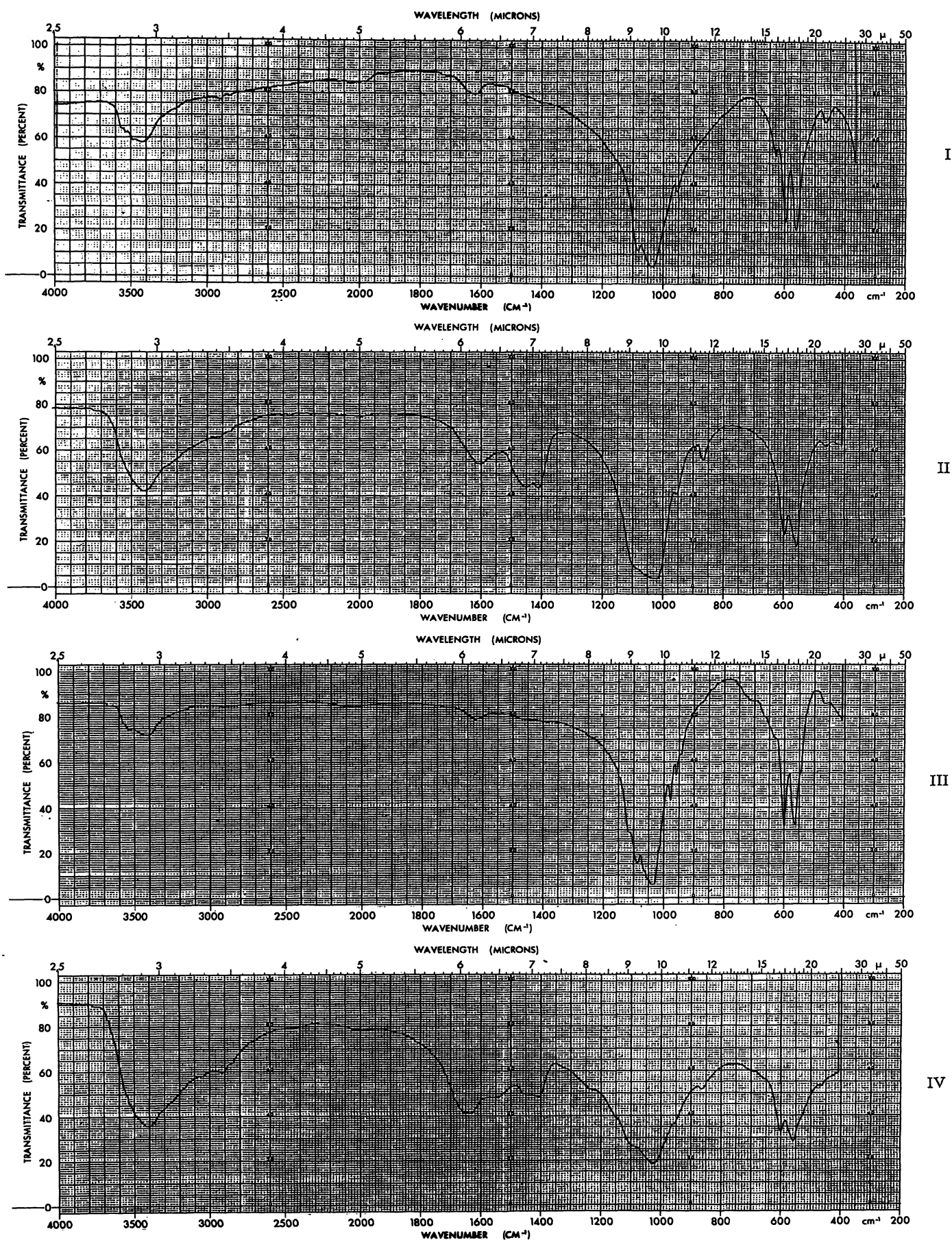


Abb. 2

Infrarotspektren von oben nach unten: I. natürlicher Hydroxylapatit aus Norwegen; II. anorganische Knochensubstanz aus der Femurspongiosa vom Rind; III. anorganische Substanz eines Kalkkörpers, bei 600–700° getempert; IV. wie III, ungetempert. Erklärung siehe Text

Methodik

Material

a) Der Femur eines frisch geschlachteten Rindes wurde von Anhangsgewebe befreit, mit Aceton und Äther entfettet und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

b) Aus verschiedenen großen, frisch gefangenen Dornhaien wurde das Skelet herauspräpariert, Kopf-, Brustflossen- und Wirbelsäulenknorpel gesondert mit Aceton und Äther behandelt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Aufschlußverfahren

a) Aufschluß mit Glycerin-KOH nach GABRIEL (8). Aufschlußlösung: 30 g KOH in 1000 ml Glycerin. 10 g getrocknete und pulverisierte Knochen- bzw. zerkleinerte Knorpelsubstanz wurde mit 100 ml Aufschlußlösung 1 Std. auf 200° erhitzt, auf 150° abgekühlt, in 500 ml kochendes Wasser gegossen und die anorganische Substanz nach Abkühlen der Lösung abzentrifugiert. Der Rückstand wurde so lange mit dest. Wasser gewaschen, bis er alkalifrei war, und dann bei 100° getrocknet.

b) Aufschluß mit wasserfreiem Formamid nach THOMAS (9). Trockene Knorpel- bzw. Knochen wurden 1:10 (w/w) mit wasserfreiem, frisch destilliertem Formamid übergossen und 48 Stdn. lang im Rundkolben unter Rühren auf 130° erhitzt. Nach Abzentrifugieren des Rückstandes und Waschen mit frischem Formamid wurde der Aufschluß für 24 Stdn. bei 130° fortgeführt. Den dunklen Rückstand wusch man dann wiederum mehrere Male mit frischem Formamid und schließlich so lange mit dest. Wasser, bis im Waschwasser kein Stickstoff mehr nach-

zuweisen war. Getrocknet wurde die meist schwach gelb gefärbte Substanz bei 100° im Trockenschrank.

c) Abbau der organischen Substanzen mit Papain bei pH 5,6. 10 g entfettetes Knorpelgewebe wurden in 100 ml einer Enzymlösung (5,0 g Papain [Merck], 13,6 g Natriumacetat · 3 H₂O, 0,8728 g Cystein · HCl · H₂O und 1,8612 g EDTA [Titrplex III Merck] wurden in 1 l Wasser gelöst) suspendiert, 20 Stdn. bei 65° aufbewahrt und der Überstand vorsichtig vom Rückstand, der sich gut absetzte, abgegossen. Der Rückstand wurde dann mehrmals mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ bei Raumtemperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Analytik

Die Calcium-, Magnesium-, Fluor- und CO₂-Analysen haben wir nach bekannten Verfahren (11) durchgeführt, Phosphor wurde nach PILZ (18), Hydroxyprolin nach STEGEMANN (19) und Hexosamin nach CESSI (20) bestimmt.

Die Debye-Scherrer-Diagramme wurden mit dem Gerät Müller Mikro 111 aufgenommen. Als Strahlenquelle diente eine Eisenröhre, als Filter ein Manganfilter. Belichtet wurde 4 Stdn. bei einer Anregung von 34 kV und 10 mA.

Die Infrarotspektren haben wir mit dem Gitterspektrographen Perkin-Elmer PE 521 aufgenommen, die Substanzen waren in KBr gepreßt (1,8 mg I + 320 mg KBr; 1,2 mg II + 345 mg KBr; 1,23 mg III + 325 mg KBr; 2,5 mg IV + 347,5 mg KBr; Spaltprogramm 927).

Der Bergbau-Berufsgenossenschaft Bochum danken wir für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten.

Literatur

1. WEIDMANN, S. M., in „International Review of Connective Tissue Research“, ed. D. A. Hall, Volume I, S. 339, Academic Press (1963).
2. BRANDENBERGER, E., Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich 90, 250 (1945).
3. KLEMENT, R., Naturwissenschaften 26, 145 (1938).
4. WURMBACH, H., Zool. Jahrbuch Anat. Abt. 55, 1 (1932).
5. SCHMIDT, W. J., Zschr. Zellforsch. 37, 377 (1952).
6. BECKER, H., K. HOEGEN und G. PFEFFERKORN, Acta anat. Basel 20, 105 (1954).
7. MATHEWS, M. B., in „Structure and Function of Connective and Skeletal Tissue“, Butterworths, London (1965).
8. GABRIEL, S., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 18, 257 (1894).
9. THOMAS, K. und H. STEGEMANN, Beitr. Silikoseforschung Heft 28, 1 (1954).
10. GLEES, P., Acta Neerl. morph. 1, 171 (1937).
11. STEGEMANN, H. und G. F. JUNG, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 320, 272 (1960).
12. TRÖMEL, G. Z. physik. Chem., Abt. A 158, 442 (1932).
13. MEHMEI, M., Z. physik. Chem., Abt. B 15, 223 (1932).
14. NEWSELY, H., Fortschr. chem. Forsch. 5, 688 (1966); Angew. Chem. 79, 384 (1967).
15. HAYEK, E., Klin. Wschr. 45, 857 (1967).
16. DALLEMAGNE, M. J., L. WINAND, H. HERMAN und C. FABRY, Bull. Acad. méd. Belgique VII, 1, 749 (1961).
17. BRUNAUER, St., P. H. EMMETT und E. TELLER, J. Amer. chem. Soc. 60, 309 (1938).
18. PILZ, W., Microchim. Acta 1965/I, 34.
19. STEGEMANN, H., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 311, 41 (1958).
20. CESSI, C. und F. PILIEGO, Biochem. J. 77, 508 (1960).

Priv.-Doz. Dr. M. Liefländer
34 Göttingen
Hermann-Rein-Str. 3